

## (12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2002年4月4日 (04.04.2002)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 02/26788 A1

(51) 国際特許分類<sup>7</sup>: C07K 14/415, C07F 9/10, A23L 1/035, A61K 7/00  
 (21) 国際出願番号: PCT/JP01/08457  
 (22) 国際出願日: 2001年9月27日 (27.09.2001)  
 (25) 国際出願の言語: 日本語  
 (26) 国際公開の言語: 日本語  
 (30) 優先権データ:  
 特願2000-296781 2000年9月28日 (28.09.2000) JP  
 特願2001-178625 2001年6月13日 (13.06.2001) JP  
 (74) 代理人: 平木祐輔, 外 (HIRAKI, Yusuke et al.); 〒105-0001 東京都港区虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門5森ビル3F Tokyo (JP).

(81) 指定国(国内): AU, BR, CA, CN, JP, US.  
 (84) 指定国(広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 味の素株式会社 (AJINOMOTO CO., INC.) [JP/JP]; 〒104-8315 東京都中央区京橋一丁目15番1号 Tokyo (JP).

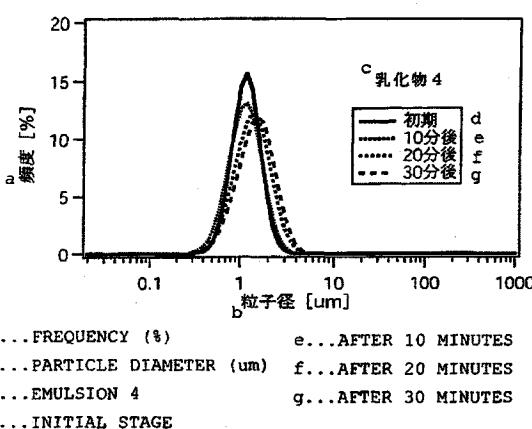
(72) 発明者; および  
 (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 原田拓也

添付公開書類:  
 — 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドスノート」を参照。

(54) Title: OLEOSIN/PHOSPHOLIPID COMPLEX AND PROCESS FOR PRODUCING THE SAME

(54) 発明の名称: オレオシン/リン脂質複合体及びその製造方法



(57) Abstract: An emulsion stabilizer which occurs in nature, has a high safety, can be used alone in emulsification and can be added to other emulsifiers too. More particularly, an oleosin/phospholipid complex obtained from the oil body of plant seeds is provided as an emulsion stabilizer.

(57) 要約:

WO 02/26788 A1

本発明は、天然に存在し、安全性が高く、単独として乳化に用いることができ、他の乳化剤に添加することもできる乳化安定剤を提供する。具体的には、本発明は植物種子中のオイルボディーから得られるオレオシン/リン脂質複合体を乳化安定剤として提供する。

## 明細書

## オレオシン／リン脂質複合体及びその製造方法

## 技術分野

本発明は、新規な乳化安定剤及びこれを用いた乳化物に関し、さらに詳しくは、水と油脂の混合物である乳化物を製造する際に、単独で用いて安定な乳化物を作成することができ、あるいは他の乳化剤に加えて助剤として用いることで乳化物を安定させることもできる、植物由来で安全性の高いオレオシン／リン脂質複合体を含有する乳化安定剤、及びこの乳化安定剤を用いた乳化物に関する。

## 背景技術

水中に油滴をあるいは油中に水滴を均一に分散させた乳化物は、マヨネーズ、ドレッシングなどの食品、インクや塗料などの工業製品などを構成するものであるが、元来水と油は混合しにくく、そのためこれを乳化するために乳化剤が利用されている。

水と油が混合しにくいのは、両者の間に高い界面張力が存在するためであり、乳化剤はこれを低下させることで乳化状態の破壊を遅らせる。乳化剤としては、天然及び合成の界面活性剤が利用されており、例えば食品分野においては、モノグリセリド、ショ糖脂肪酸エステル、ソルビタン脂肪酸エステル、大豆レシチン（リン脂質）等が良く使用されている。乳化剤には、高い乳化安定性と共に、安全性が要求されるため、この要件を満たす、特に天然に存在する新たな乳化剤に対する需要があった。

一方、大豆等の植物種子中には、中性油脂の微粒子がリン脂質と「オレオシン」と呼ばれる塩基性タンパク質で覆われた小器官「オイルボディー」が存在していることが知られている。オイルボディーは天然の乳化物とも言うべき性質を有しており、種子が乾燥してもこの構造は破壊されず、乳化物として安定である。

このオイルボディーを大豆から調製してくるためには、まず大豆を水に浸漬後、ホモジナイズし、豆乳を調製し、その豆乳を高速遠心することにより、浮上画分にオイルボディーが分離してくることが知られている。そして、洗浄、高速遠心を繰り返すことにより、精製オイルボディーを調製する方法が一般的である (Plant Physiol. 101 993(1993))。

オイルボディー中に貯蔵油脂として存在する油脂を酵素的に抽出すると、中性油、リン脂質、塩基性タンパク質、貯蔵タンパク質並びにこれらの部分分解物によって乳化物が形成され易く、また一旦形成された乳化物を含む組成物から油層を分別することは極めて困難であった。本出願人は先に、オイルボディーの安定性を利用して、油糧種子からオイルボディーを含む高濃度油脂含有物を分離する方法 (特開平11-56248号及び特願2000-204532号) を見出したが、これは新たに乳化物を作成するために利用したものではなかった。

特開平11-56248号で「高濃度油脂含有物」と呼称している「大豆貯蔵タンパク質を多量に含む精製オイルボディー」は、オイルボディー内に存在する油脂 (内相油脂) を除去していないために、これを乳化剤として用いた場合、界面はオレオシンではなく不純な大豆貯蔵タンパク質が形成することになる。また、仮にオイルボディーの内相油脂を除去したとしても、後述の乳化安定作用を有することを本発明で示したオレオシンと比較して、不純な大豆貯蔵タンパク質の比率ははるかに高く、オレオシンのタンパク質精製度としては20%以下になる。そのため、界面を構成するのはやはり大豆貯蔵タンパク質が主体となり、本発明における乳化安定化効果は示さない。

更に、オイルボディーの界面に存在するタンパク質であるオレオシンに乳化安定剤としての機能があることは報告されていた (R. Su, Biochem. J., 235, 57 (1986)) が、オレオシンを単独で精製すると重合 (D. J. Murphy, Prog. Lipid Res., 32, 247 (1993)) し、水に分散しなくなるという問題があった。そのため、精製したオレオシンとリン脂質を油と混合し、超音波をかけてオイルボディーを再構成した報告 (J. T. C. Tzen, J. Cell Biol., 117,

327(1992)) が存在するものの、オレオシンは超音波をかけてもなお懸濁状態であり、コロイドミル、マイクロフルイダイザーといった連続乳化機では乳化するどころか、逆に解乳化を惹起することが予測される。

一方、大豆オイルボディーを調製する操作は、図 3 に示すように、非常に煩雑で、かつ、得られた大豆オイルボディーは、大豆特有の「大豆臭さ」「青くささ」があり、この 2 点が大豆オイルボディーを素材として使いこなす上での障害となっていた。

この大豆特有の臭いは、香気というより、むしろ好ましくない不快臭と呼んだ方が適切であり、従ってこの成分を除去することが大豆オイルボディー素材化の重要なポイントである。

大豆の不快臭は、大豆中に存在する酵素である、リポキシゲナーゼが大豆油を酸化することに起因している。リポキシゲナーゼはシス、シス-1,4-ペントジエン構造を有する不飽和脂肪酸や不飽和脂肪に分子状酸素を添加し、ヒドロペルオキシドを生成する酵素であり、植物界に広く存在することが知られている。大豆種子には特に多く、種子全体の 1 % も含まれている。不快臭の原因となる化合物は本酵素によって生成された酸化産物(ヒドロペルオキシド)が分解して生じる中鎖アルデヒド・アルコール類やフラン類やケトン類であると考えられ、その代表的成分が n-ヘキサナールである。

大豆において、リポキシゲナーゼによる不快臭発生を抑える為に、従来加熱処理による酵素の不活性化が行われており、特開昭 58-71859 号では、丸大豆を水分含量 30~60wt% の範囲にし、80°C 前後の温度で、粉碎処理し、大豆臭の発生を防止する方法、特開昭 59-140845 号では、丸大豆を加圧化下で 150~190°C の過熱水蒸気にて 2 秒~5 分加熱処理を行った後、粉碎し、脱臭全脂大豆粉を製造する方法、特開昭 61-187763 号では、常圧、80°C 以上 95°C 以下の湿熱雰囲気中を通過させることにより無臭大豆を製造する方法が開示されている。

しかし、これらの特許は、大豆や全脂大豆粉、豆乳の不快臭の発生を抑えるもののみで、大豆オイルボディーの加熱による不快臭抑制については、

全く検討されていなかった。その理由としては、一般に乳化物は加熱に対して不安定であるということ等が挙げられる。こうした現状から、従来、天然に存在し、安全性が高い乳化素材であるにも関わらず、不快臭の抑制ができないために大豆オイルボディーの乳化製品への利用はほとんどされていなかった。

すなわち、オイルボディー及びその構成タンパク質であるオレオシンの存在は知られていたが、これらを新たな乳化物を作成するための有効な乳化安定剤として利用する試みは未だ成功したとはいえない状況であった。

オイルボディーはそれ自体安定な乳化物であるが、中性油脂、リン脂質、タンパク質から構成される複合体構造をとっているため、加熱処理によってこの構造及び乳化特性が変化する可能性もあった。

本発明の目的は、上記の課題を解決し、天然に存在し、安全性が高く、単独で、または他の乳化剤と組み合わせて使用することができる、オレオシンを含有する新規な乳化安定剤を提供するものである。

本発明の別の目的は、天然に存在し、安全性が高い、良好な乳化素材である大豆オイルボディーの不快臭を除去すると共に、簡便な製法を提供するものである。

## 発明の開示

本発明者らは上記課題を解決できる乳化安定剤につき鋭意検討した結果、油脂が乳化状態となって含有されている植物種子の油脂貯蔵形態（オイルボディー）の界面に存在するタンパク質（オレオシン）とリン脂質の複合体をそのまま取り出し、乳化物を再構成することで、この複合体が乳化安定剤として機能することを見いだし、本発明を完成した。

更に、本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討した結果、丸大豆を水に浸漬し、膨潤させた後、80～90℃で1～5分間加熱し、大豆中のリポキシゲナーゼを失活させることにより、無臭のオイルボディーが得られ、また、遠心による分離操作を1回行うのみで、大豆貯蔵タンパク質と容易に分離することを見い出し、本発明を完成した。

すなわち本発明は、植物種子からオイルボディーを分離、精製した後に油と分離して得られるオレオシンとリン脂質の複合体（以下、オレオシン／リン脂質複合体という）に関し、以下の（1）～（10）を提供するものである。

- (1) 植物種子中のオイルボディーを精製した後、圧搾して内相油脂を除去したオレオシン／リン脂質複合体。
- (2) 総油脂含量が30%以下で、タンパク質精製度が95%以上である、植物種子由来のオレオシン／リン脂質複合体。
- (3) 植物が大豆、菜種、トウモロコシ、ヒマワリ、または胡麻から選択されるものである、上記（1）または（2）に記載のオレオシン／リン脂質複合体。
- (4) オレオシンとリン脂質との比率が70:30～50:50（重量比）であることを特徴とする、上記（1）から（3）のいずれかに記載のオレオシン／リン脂質複合体。
- (5) オイルボディーが、大豆を水に膨潤させ、加熱した後、水溶液中で磨碎して豆乳を調製し、遠心分離することによって得られる無臭大豆オイルボディーである、上記（1）から（4）のいずれかに記載のオレオシン／リン脂質複合体。
- (6) 植物種子中のオイルボディーを単離精製後、圧搾して回収することを特徴とする、上記（1）から（5）のいずれかに記載のオレオシン／リン脂質複合体の製造方法。
- (7) オイルボディーが、大豆を水に膨潤させ、加熱した後、水溶液中で磨碎して豆乳を調製し、遠心分離することによって得られる無臭大豆オイルボディーである、上記（6）に記載のオレオシン／リン脂質複合体の製造方法。
- (8) 上記（1）から（5）のいずれかに記載のオレオシン／リン脂質複合体を含有する乳化安定剤。
- (9) 上記（1）から（5）のいずれかに記載のオレオシン／リン脂質

複合体を被乳化油脂に対して 1 重量 % 以上含有することを特徴とする乳化物。

(10) 上記 (1) から (5) のいずれかに記載のオレオシン／リン脂質複合体を、オレオシン含量に換算して、被乳化油脂に対して 0.7 重量 % 以上含有することを特徴とする乳化物。

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願第 2001-178625 号及び第 2000-296781 号の明細書及び／または図面に記載される内容を包含する。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、大豆の精製オイルボディーを SDS-PAGE にかけた結果を示す。

左側：オレオシン、右側：分子量マーカー

図 2 は、オレオシン／リン脂質複合体による乳化物の安定化を示す。

図 3 は、オイルボディーの一般的な製造方法のフローチャートを示す。

図 4 は、一般的なオイルボディーの製造方法の 1 ～ 3 回目の遠心分離における浮上画分を SDS-PAGE にかけた結果を示す。

図 5 は、無臭大豆オイルボディーの製造方法のフローチャートを示す。

図 6 は、無臭大豆オイルボディーを SDS-PAGE にかけた結果を示す。

左側：オレオシン、右側：分子量マーカー

図 7 は、無臭大豆オイルボディー及び対照におけるヘキサンール含量の比較を示す。

#### 発明を実施するための形態

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明において用いられる植物としては、種子中に油脂が存在するものであれば特にその属、種について限定されることはないが、その含量が多い大豆、菜種、トウモロコシ、ヒマワリ、胡麻などのいわゆる油糧種子が

好ましく用いられる。

植物として大豆を用いる場合、丸大豆、または脱皮した丸大豆、又は荒割大豆等、粉碎されていない大豆であれば特にその属、種について限定されるものではない。

大豆を除く油糧種子を原料として用いる場合、予め脱皮または粗割碎すると、回収率を向上させることができるので好ましい。

本発明に使用するオイルボディーの精製法としては、例えば大豆では、丸大豆から粗水抽出液（豆乳）を作成し、アルカリ性にして大豆タンパク質を可溶化するとともに塩を加えてオイルボディーを凝集させ、その凝集したオイルボディーを遠心分離によって回収する。菜種の場合は脱皮、圧扁した菜種、または物理的な方法で1回搾油した残渣からの水抽出液よりオイルボディーを凝集させて回収する。

具体的には、上記油糧種子またはその脱皮もしくは粗割碎物を水に6～24時間、好ましくは一晩程度浸漬した後、当該油糧種子またはその脱皮もしくは粗割碎物を磨碎する。磨碎の際の加水量は油糧種子またはその脱皮もしくは粗割碎物の約5～13倍容、好ましくは約7～10倍容が適当である。磨碎はジューサー、湿式磨碎機等の磨碎機を用いて行う。次いで、磨碎物を固一液分離装置、例えば振り切り型遠心分離機にかけて粗水抽出液と残渣を分離する。この残渣は、原料が大豆の場合、豆腐製造時のオカラに相当するものである。当該残渣を3～7倍容、好ましくは4～5倍容の水で1～4回洗浄する。この洗浄液と前記粗水抽出液とを合わせて粗水抽出液とする。

また、本発明に使用するオイルボディーとして、下記方法によって調製される無臭大豆オイルボディーを使用することもできる。本明細書において、「無臭」とは、大豆特有の「大豆臭さ」、「青くささ」が低減していることを指し、その指標の一つとして大豆特有の不快臭の代表的成分であるn-ヘキサナール含量を用いることができる。

大豆臭発生の要因となるリポキシゲナーゼの加熱失活方法は、できるだけ、タンパク質の変性がなくリポキシゲナーゼのみを失活させることが理

想である。

リポキシゲナーゼを加熱失活させる方法としては、大豆を蒸煮する、煮る、電子レンジ加熱等がある。それぞれの加熱方法により加熱した、丸大豆中のリポキシゲナーゼ残存活性は、電子レンジ加熱の場合、5分処理で11%。蒸煮する場合、5分処理で0%、また、熱水処理の場合、70°C 15分処理で60%。80°C 1分処理で10%。100°C 0.5分で0%である。

できるだけタンパク質の変性がなく、リポキシゲナーゼを失活させ、無臭のオイルボディーを得るには、80～90°Cで1～5分間加熱することが望ましく、その加熱方法は特に問わない。

リポキシゲナーゼ失活大豆よりオイルボディーを調製するには、リポキシゲナーゼ失活大豆より豆乳を作成し、大豆タンパク質を可溶化した後、オイルボディーを分離回収する。

具体的には、粉碎していない大豆を、水に6～24時間浸漬し、膨潤させた後、80～90°Cで1～5分間加熱し、大豆中のリポキシゲナーゼを失活させた後、磨碎する。磨碎の際の加水量は大豆の約3～10倍容、好ましくは約4倍容が適当である。磨碎は、ジューサー、湿式磨碎機等の磨碎機を用いて行う。磨碎に用いる溶液は、アルカリ性で、0.01～0.5M程度の塩が含まれているものが回収率等の点において好ましい。

次いで、磨碎物を固一液分離装置、例えば振り切り型遠心分離機にかけて粗抽出液と残さを分離する。このように調製された豆乳からオイルボディーを遠心分離によって回収する。遠心力はオイルボディーが浮上すればどのような強さでもよいが、回収率、精製度等を考慮すると、16000G以上の遠心力が好ましい。尚、上記無臭大豆オイルボディーの製造方法を、図5にフローチャートで示す。

このようにして得られた精製オイルボディーは、白く、臭いも無く、安定性の高いクリーム状の乳化物であり、様々な物に利用することができる。

上記無臭大豆オイルボディーは、食品、化粧品及び化成品等の乳化製品にそのまま使用することができる。無臭大豆オイルボディーを含有することで、製造が容易でありながら乳化性能に優れ、かつ大豆特有の不快臭が

感じられない、高い品質の乳化製品を得ることが可能となる。

上記のようにして得られた精製オイルボディーは、安定性が高いが、好ましくは乾燥して油脂比率を高め、その後圧搾すると容易に乳化状態を破壊できる。こうして、オイルボディー内に存在する油脂（内相油脂）を取り除くことで、乳化安定効果の高い、本発明のオレオシン／リン脂質複合体またはそれを含んだ混合物を取得することができる。すなわち、「精製オイルボディー」は本発明の「オレオシン／リン脂質複合体」ではなく、精製オイルボディーを圧搾して内相油脂を除去したものが本発明でいう「オレオシン／リン脂質複合体」である。具体的には、油脂含量が30%以下で、タンパク質精製度が95%以上のオレオシン／リン脂質複合体をいう。なお、ここでいう油脂は、内相油脂のほかオレオシン／リン脂質複合体への付着油脂も含めた総油脂をさす。

一方、除去された内相油脂は、有機溶剤と接触せずに回収された油脂として有効に利用することができる。

本発明の内相油脂を除去したオレオシン／リン脂質複合体またはその含有物は、オレオシン／リン脂質複合体：油脂=70以上：30以下が好ましく、精製オイルボディー中の油脂に対する得られた内相油脂を除去したオレオシン／リン脂質複合体またはその含有物の除去された油脂の比率（内相油脂の除去率）は高値ほど好ましいが、70%以上であれば、本発明の効果を充分奏する。

更に、本発明の内相油脂を除去したオレオシン／リン脂質複合体またはその含有物のタンパク質精製度（内相油脂を除去したオレオシン／リン脂質複合体またはその含有物の全タンパク質中のオレオシンタンパク質の比率をさす）は高値ほど好ましいが、50%以上であれば本発明の乳化安定効果を有することができるが、好ましくは95%以上の精製度が良い。

ちなみに、前記の方法で処理した大豆の精製オイルボディーをSDS-PAGEにかけると、24kDa、18kDa、17kDaの3種類のタンパク質のみが含まれ、これらのタンパク質をオレオシンと呼ぶ（図1）。圧搾によって得られるオレオシンとリン脂質の比率は、原料にした植物種

子のオイルボディーの界面での比率と同じとなり、好ましくは 75 : 25 ~ 50 : 50 (重量比) の範囲であり、これをそのまま乳化安定剤として使用し得る。また、リン脂質は、原料に含まれるリン脂質の種類及び比率でそのまま含まれていれば良く、特に限定されるものではない。上記大豆等の原料から本発明の方法によって得られる複合体中に含まれるリン脂質としては、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジン酸、カルジオリピン、スフィンゴミエリン等が挙げられる。また、このときのオレオシンは単独で精製したときと異なり、重合せずに水に易分散の状態であることから、複合体を形成していると考えられる。

上記のようにして得られたオレオシン/リン脂質複合体は乳化能を有しており、乳化安定剤として好適に用いることができる。従って本発明は、オレオシン/リン脂質複合体を含有する乳化安定剤を提供する。本発明において、総油脂含量が 30% 以下で、タンパク質精製度が 95% 以上であるオレオシン/リン脂質複合体は、被乳化油脂に対して 1 重量% 以上、好ましくは 3 重量% 以上の比率で添加・混合せしめるのが良い。

更に、本発明のオレオシン/リン脂質複合体及びそれを添加する溶液中にフリーのリン脂質が過剰量存在すると、このリン脂質が水-油の界面に対してオレオシンと競争的に吸着し、吸着したリン脂質は酸性条件あるいは塩の存在下で乳化物の凝集を起こすため、本発明の効果が低減する。従って、フリーのリン脂質量は少ない方が好ましい。

乳化安定剤として、オレオシン/リン脂質複合体を単独で使用しても良いが、食品、化粧品及び化成品製造分野において通常使用される他の乳化剤及び乳化安定剤と組み合わせて使用しても良い。他の乳化剤及び乳化安定剤としては、例えばモノグリセリド、コンドロイチン硫酸ナトリウム、ショ糖脂肪酸エステル、ソルビタン脂肪酸エステル、大豆レシチン(リン脂質)、ポリグリセリン脂肪酸エステル等が挙げられる。

尚、本発明のオレオシン/リン脂質複合体、その他の乳化剤及び乳化安

定剤によって乳化される油脂（被乳化油脂）としては、例えば食品用途として大豆油、綿実油、コーン油、菜種油、化粧品用途として流動パラフィン、ワセリン、スクワラン等が挙げられる。

本発明はまた、上記オレオシン／リン脂質複合体を、好ましくは被乳化油脂に対して1重量%以上、好ましくは3重量%以上含有することを特徴とする乳化物を提供する。乳化形態は特に限定するものではないが、水中油型乳化物であるのが好ましい。本発明の乳化物は、乳化安定剤として本発明に係る複合体を必須に含有する他、上記の如く他の乳化剤、乳化安定剤を適宜配合することができ、例えばモノグリセリド、コンドロイチン硫酸ナトリウム、ショ糖脂肪酸エステル、ソルビタン脂肪酸エステル、大豆レシチン（リン脂質）、ポリグリセリン脂肪酸エステル等を本発明に係るオレオシン／リン脂質複合体と適宜組み合わせて使用することができる。本発明の乳化物はまた、食品、化粧品及び化成品製造分野において通常使用される酸化防止剤、着香料、着色料、保存料等を必要に応じて含有しても良い。

### 実施例

次に、本発明の効果を実施例及び比較例により詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

#### 実施例1 オイルボディーの精製

オイルボディーの精製法としては、公知の手法（E. M. Herman, *Planta*, 172, 336 (1987)）に準じ、例えば大豆を4倍量の蒸留水で1晩膨潤後、蒸留水を捨ててから4倍量の0.1M Tris-HCl (pH 8.6) / 3mM MgCl<sub>2</sub>を加え、粉碎機で破碎して、分散液を得る。この分散液を、ガーゼでおからと豆乳に分ける。豆乳に30000G、30分間の遠心分離にかけて粗オイルボディーAを得る。

粗オイルボディーAに4倍量の0.5M NaCl / 0.1M Tris-HCl (pH 8.6) / 3mM MgCl<sub>2</sub>を加えて分散し、再度30000G、30分間の遠心分離にかけて粗オイルボディーBを得る。

粗オイルボディーBに4倍量の0.1M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ を加えて分散し、再度30000G、30分間の遠心分離にかけて精製オイルボディーを得る。この精製オイルボディーにおけるタンパク質とリン脂質の比率は71:29であった。

大豆の精製オイルボディーをSDS-PAGEにかけると、24kDa、18kDa、17kDaの3種類のタンパク質のみが含まれていた。これらのタンパク質がオレオシンと称される。結果を図1に示す。

こうして得られた精製オイルボディーは、安定性が高く、しかもオレオシンを単離すると重合してしまう。

### 実施例2 製造方法の検討

精製オイルボディーを乾燥して油脂比率を高めることで、圧搾して容易に乳化状態を破壊し、残存する界面成分であるオレオシンとリン脂質の複合体（オレオシン／リン脂質複合体）を乳化安定剤として使用することができる。このときの搾油量は圧力、時間、装置形状などの要素によって変化するが、たとえば乾燥オイルボディーを厚さ0.5mmに成形し、20MPaの圧力を3分間加えると、内相油脂の75%が排除される。この結果、オレオシンとリン脂質の複合体を75.5重量%、大豆油を24.5重量%含む混合物が得られた。圧搾によって得られるオレオシン／リン脂質複合体中のオレオシンとリン脂質の比率は、原料にした植物種子のオイルボディーの界面での比率と同じであり、これは大豆を原料としたときに7:3にあたる。また、このときのオレオシンは単独で精製したときと異なり、重合せずに水に易分散の状態であることから、複合体を形成していると考えられた。

これに対して、Tzen (J. T. C. Tzen, J. Cell Biol., 117, 327 (1992)) の方法に従い、クロロホルムとメタノールの混合溶媒で大豆からオレオシンを抽出したところ、オレオシン単独では重合して、局的に強い剪断力をかける超音波発生装置のような特殊な機材を用いないと再分散ができないかった。

### 実施例3 乳化安定性の確認

実施例 2 で得られたオレオシン／リン脂質複合体を乳化安定剤として用いた際の乳化安定性について示す。なお、表 1 中の単位は重量部を表す。

表 1

乳化物	1	2	3	4	5
複合体	0.02	0.05	0.1	0.3	
リン脂質	0.08	0.05			1
大豆油	10	10	10	10	10
蒸留水	90	90	90	90	90

まず、ガラス製ビーカーに表 1 に示した比率の大豆由来のオレオシン／リン脂質複合体、リン脂質（大豆リン脂質、S L P ホワイト、ツルーレシチン工業）、蒸留水を取り（全量で 100 g）、70 °C に加温して完全に溶解（水画分）させた。次に、大豆油を他の容器で同温に加熱しておき、水画分に滴下しながらディスパーザー（IKA Werke GmbH）で 5 分間分散させた。こうしてできた粒子径 6 ~ 7 μm の粗乳化物を、高压乳化機マイクロフルイダイザー（Microfluidics International Corp.、20 MPa）にかけて、粒子径 1 μm の乳化物を調製した。

粒子径 1 μm の水中油型乳化物は、1 G の自然環境において、油滴の重力による浮上がプラウン運動によってうち消され、いわゆるクリーミングを起こさない。これに遠心分離による負荷を与えると、制御された環境下でクリーミングを起こせることから、乳化物の安定性を明確に把握することができる。

そこで、乳化物 1 ~ 5 の 30 mL を遠心機用の 50 mL チューブに移した。この状態では組成物の高さは約 5 cm となる。遠心力として 3000 G を設定し、遠心開始後 10 分おきに組成物を 500 uL ずつとり、粒度分布計及び目視で安定性評価を行った。

結果を図 2 および表 2 に示す。

表 2

乳化物	1	2	3	4	5
直後	○	○	○	○	○
10分	×	×	△	○	×
20分	×	×	△	○	×
30分	×	×	△	○	×

○変化無し  
 △油滴粗大化  
 ×油脂分離

リン脂質を 1 重量部含有するのみで、オレオシン／リン脂質複合体を含有しない乳化物 5 は速やかに油滴の分離を起こすのに対し、特にオレオシン／リン脂質複合体を 0.3 重量部含有する乳化物 4 では、図 2 および表 2 に示すように、30 分経過後においても油滴の粗大化が微小であり、また油脂の分離が全くなく、非常に安定であった。また、オレオシン／リン脂質複合体の添加量を増やすと油滴径の変化が抑制される(乳化物 1 ~ 3)ことから、オレオシン／リン脂質複合体に乳化安定剤としての機能があることが示された。また、乳化物を効果的に安定化させるには、油に対して 1 重量% 以上の添加が望ましい(乳化物 3 及び 4)。本実施例において使用したオレオシン／リン脂質複合体 1 重量% 中には、オレオシンが 0.7 重量%、リン脂質が 0.3 重量% 含まれていた。

#### 実施例 4 無臭大豆オイルボディーの製造方法

丸大豆を水に一晩浸漬、膨潤させた後、加熱をし、85℃に達した後、1 分間リポキシゲナーゼ失活処理を行う。その後、熱水を捨て、大豆の約 4 倍量の 0.1M Tris-HCl(pH 8.6)/3mM MgCl<sub>2</sub> を加え、粉碎機で粉碎して、分散液を得る。この分散液を振り切り型遠心分離機(100 メッシュのろ布を使用し 2000rpm にて分離)(三陽理科学器械製作所株製)でおからと豆乳に分ける。得られた豆乳に 30000G(17,000rpm)、30 分の遠心分離を行い、精製オイルボディーを得る(図 5)。その後、必要に応じて、精

製の際に用いた 0.1M Tris-HCl(pH 8.6)/3mM MgCl<sub>2</sub> を水に置換する。

得られた大豆オイルボディーを SDS-PAGE にかけると、24kDa、18kDa、17kDa の 3 種類のタンパク質のみ含まれており、7 S 大豆グロブリン、11 S 大豆グロブリン等の主要貯蔵タンパク質ときれいに分離できていることが確認された。結果を図 6 に示す。

#### 比較例 1 一般的なオイルボディーの製造方法

一方、図 3 に示す従来の製造方法を実施した場合には、煩雑な操作が必要であるだけでなく、1 ~ 3 回目の遠心分離後の浮上画分を SDS-PAGE にかけた結果、3 回の遠心分離操作後も精製が十分でないことが明らかであった（図 4）。

#### 実施例 5 脱臭効果の確認

実施例 4 で得られた無臭大豆オイルボディーの脱臭の効果を確認するため、リポキシゲナーゼ失活処理を行わずに調製したオイルボディーをコントロールとして専門パネル 12 人による官能評価を実施した。その結果、12 人のパネルが、コントロールと比較して、大豆臭が弱くなったと評価し、大豆臭が殆ど感じられないとのコメントが多数得られた。

又、大豆不快臭の主成分である、ヘキサナール含量をガスクロマトグラフィーにて測定したところ、リポキシゲナーゼ失活処理を行っていないオイルボディーにおいては 2.3ppm 含まれていたが、実施例 4 の方法にて調製した脱臭オイルボディーでは 0.1ppm にまで減少していることを確認した（図 7）。

#### 実施例 6 オレオシン／リン脂質複合体の製造

実施例 4 で得られた無臭大豆オイルボディーを用い、実施例 2 と同様にして圧搾により内相油脂を除去し、オレオシン／リン脂質複合体を製造した。その結果、乳化安定剤として優れ、不快臭もないオレオシン／リン脂質複合体を得ることができた。

#### 実施例 7 無臭大豆オイルボディー利用食品の製造

得られた脱臭オイルボディーを用い、マヨネーズ様食品を試作してみた。配合表を表 3 に示す。

表 3

材料	(%)
オイルボディー	60
卵黄	7
食塩	2.5
砂糖	2.3
MSG	0.7
醸造酢	3.8
キサンタンガム	0.1
水	23.6

表 3 の配合にてオイルボディーと卵、調味料を均一に混合するのみで、コロイドミル等の特別な乳化工程を必要とせず、マヨネーズ様の物性と風味を持った食品が作成できた。

また、上記配合から卵黄を除いても、良好な物性を持ったマヨネーズ様食品が調製可能であった。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

#### 産業上の利用性

本発明により、植物種子中の油脂貯蔵形態の界面に存在するオレオシンとリン脂質の複合体を、乳化安定剤として使用できることが明らかとなつた。これにより、天然起源で安定性及び安全性の高い乳化物、特に水中油型乳化物が提供される。

## 請求の範囲

1. 植物種子中のオイルボディーを精製した後、圧搾して内相油脂を除去したオレオシン／リン脂質複合体。
2. 総油脂含量が30%以下で、タンパク質精製度が95%以上である、植物種子由来のオレオシン／リン脂質複合体。
3. 植物が大豆、菜種、トウモロコシ、ヒマワリ、または胡麻から選択されるものである、請求項1または2に記載のオレオシン／リン脂質複合体。
4. オレオシンとリン脂質との比率が70:30～50:50(重量比)であることを特徴とする、請求項1から3のいずれか1項に記載のオレオシン／リン脂質複合体。
5. オイルボディーが、大豆を水に膨潤させ、加熱した後、水溶液中で磨碎して豆乳を調製し、遠心分離することによって得られる無臭大豆オイルボディーである、請求項1から4のいずれか1項に記載のオレオシン／リン脂質複合体。
6. 植物種子中のオイルボディーを単離精製後、圧搾して回収することを特徴とする、請求項1から5のいずれか1項に記載のオレオシン／リン脂質複合体の製造方法。
7. オイルボディーが、大豆を水に膨潤させ、加熱した後、水溶液中で磨碎して豆乳を調製し、遠心分離することによって得られる無臭大豆オイルボディーである、請求項6に記載のオレオシン／リン脂質複合体の製造方法。

8. 請求項 1 から 5 のいずれか 1 項に記載のオレオシン／リン脂質複合体を含有する乳化安定剤。

9. 請求項 1 から 5 のいずれか 1 項に記載のオレオシン／リン脂質複合体を被乳化油脂に対して 1 重量 % 以上含有することを特徴とする乳化物。

10. 請求項 1 から 5 のいずれか 1 項に記載のオレオシン／リン脂質複合体を、オレオシン含量に換算して、被乳化油脂に対して 0.7 重量 % 以上含有することを特徴とする乳化物。

图 1

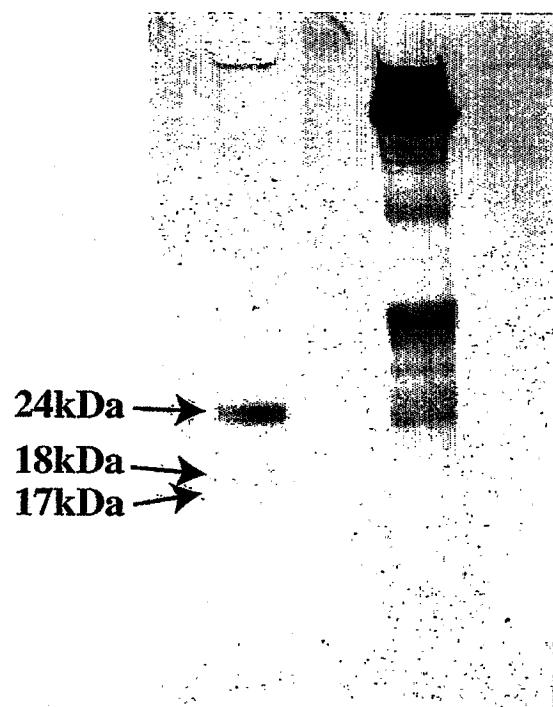


図 2

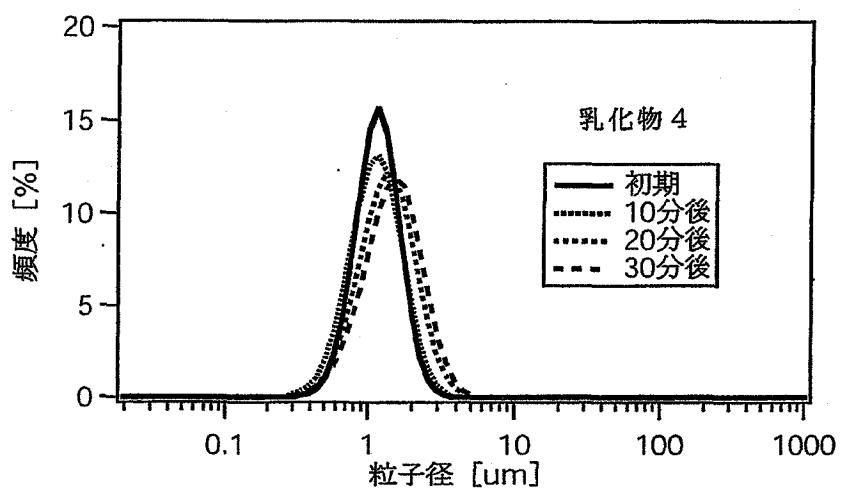


図 3

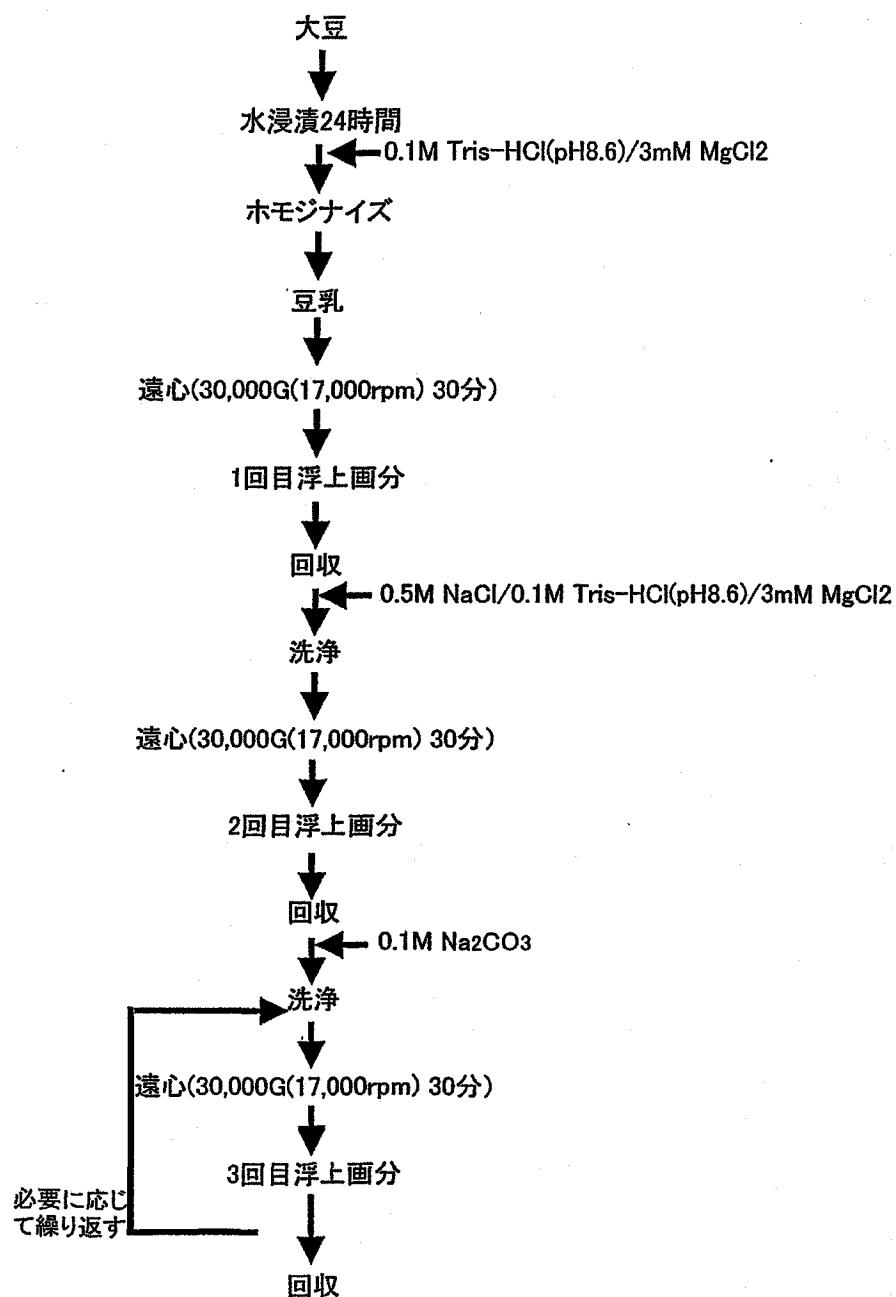
Plant Physiol. 101 993(1993)

図 4

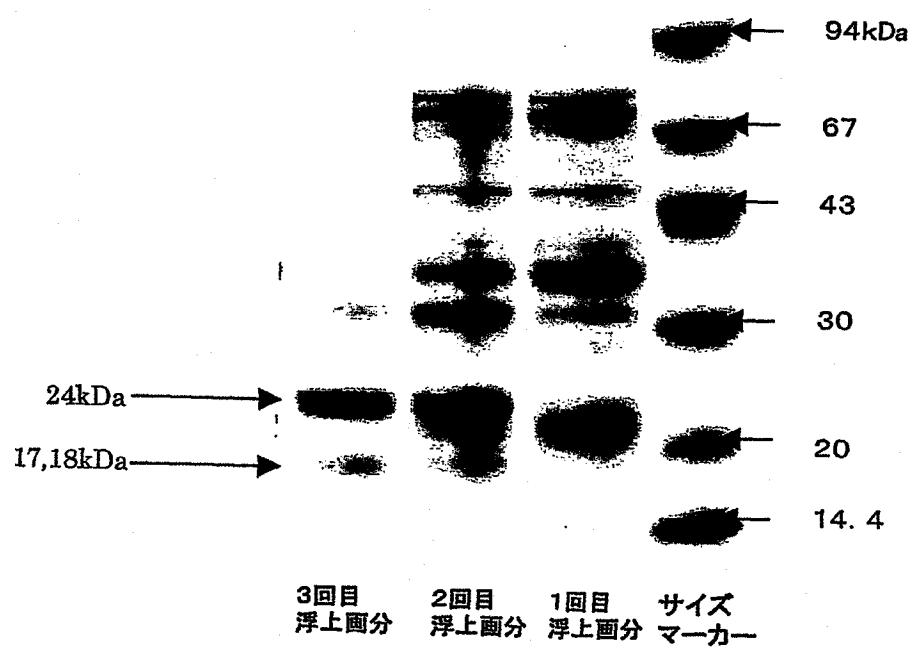


図 5

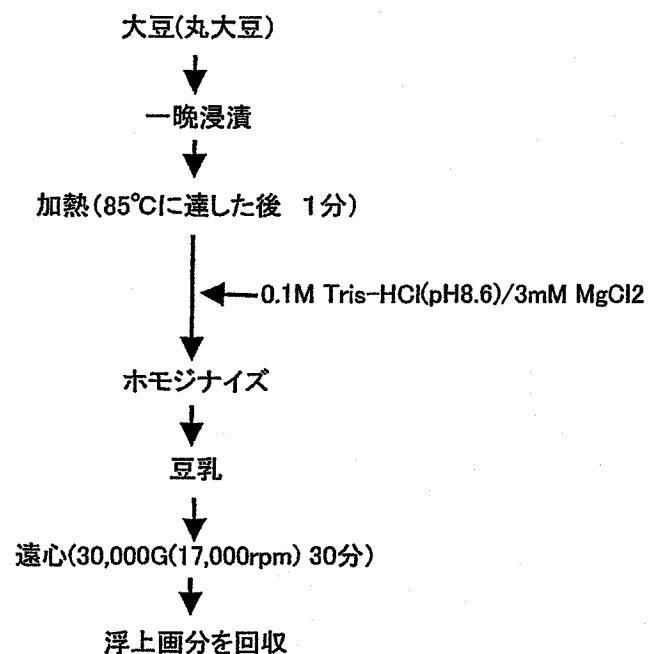


図 6

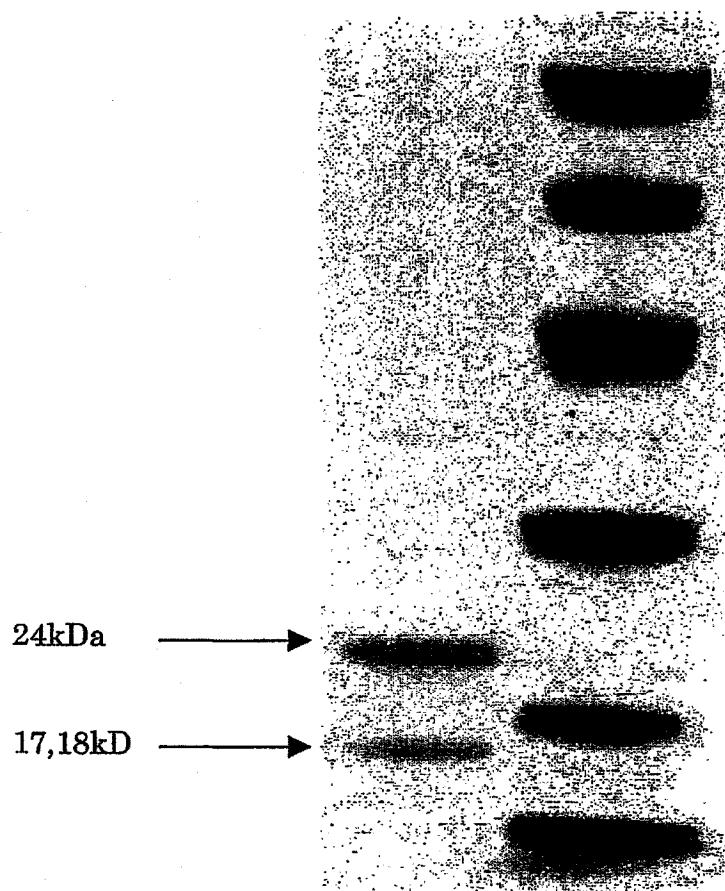
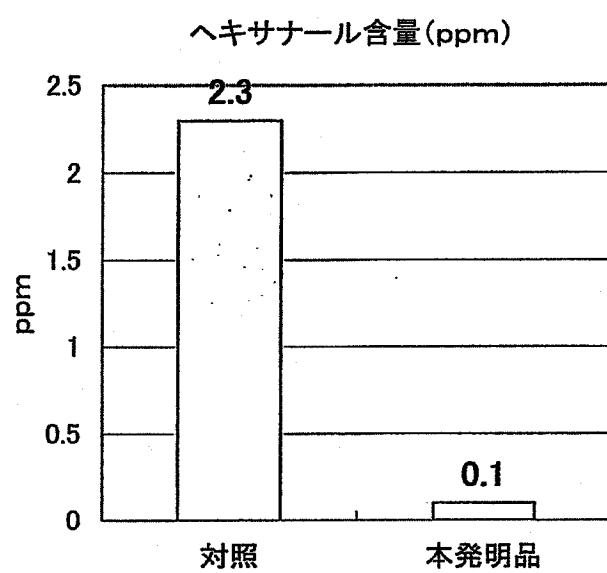


図 7



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/08457

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C07K14/415, C07F9/10, A23L1/035, A61K7/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C07K14/415, C07F9/10, A23L1/035, A61K7/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI (DIALOG) BIOSIS (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Lawrence S.H WU., et al., Classification of the Single Oleosin Isoform and Characterization of Seed Oil Bodies in Gymnosperms, Plant Cell Physiology (1999), Vol.40, No.3, pages 326-334	1-10
A	Jason T.C TZEN., et al., Coexistence of Both Oleosin Isoforms on the Surface Seed Oil Bodies and Their Individual Stabilization to the Organelles, Journal of Biochemistry (1998), Vol.123, No.2, pages 318-323	1-10
A	Jason T.C TZEN., et al., Analysis of the Three Essential Constituents of Oil Bodies in Developing Sesame Seeds, Plant and Cell Physiology (1998), Vol.39, No.1, pages 35-42	1-10
A	JP 54-138143 A (AE Staley MFG Co.), 26 October, 1979 (26.10.79), & EP 4848 A & US 4221731 A	1-10

 Further documents are listed in the continuation of Box C.  See patent family annex.

* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
---	---

Date of the actual completion of the international search  
11 December, 2001 (11.12.01)Date of mailing of the international search report  
25 December, 2001 (25.12.01)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C07K14/415, C07F9/10, A23L1/035, A61K7/00

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C07K14/415, C07F9/10, A23L1/035, A61K7/00

## 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

## 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG) BIOSIS (DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Lawrence S. H WU., et al., Classification of the Single Oleosin Isoform and Characterization of Seed Oil Bodies in Gymnosperms, Plant Cell Physiology (1999), Vol. 40, No. 3, p. 326-334	1-10
A	Jason T. C TZEN., et al., Coexistence of Both Oleosin Isoforms on the Surface Seed Oil Bodies and Their Individual Stabilization to the Organelles, Journal of Biochemistry (1998), Vol. 123, No. 2, p. 318-323	1-10

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 11.12.01	国際調査報告の発送日 25.12.01		
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 本間 夏子	4N	9637

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
A	Jason T. C TZEN., et al., Analysis of the Three Essential Constituents of Oil Bodies in Developing Sesame Seeds, Plant and Cell Physiology (1998), Vol. 39, No. 1, p. 35-42	1-10
A	JP 54-138143 A (エー・イー・ステー・マニファクチャーリング・カンパニー) 26.10月.1979 (26.10.79) & EP 4848 A & US 4221731 A	1-10